

# Modificaciones de los tRNAs Mitocondriales y Enfermedades por Mutaciones en el mtDNA

---

Alba Iguacel Martínez Márquez

*TFG Grado de Biotecnología*

## ÍNDICE

• Leyenda de Abreviaturas.....	2
• Introducción.....	3
○ Sistema de Fosforilación Oxidativa.....	3
○ Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial.....	3
○ Alteraciones en el mt-tRNA.....	4
○ Ejemplos de Patologías Relacionadas con Mutaciones en los mt-tRNAs.....	5
• Hipótesis y Objetivos.....	8
• Materiales y Métodos.....	9
○ Estudios.....	9
○ Herramientas.....	9
○ Criterios .....	10
• Resultados.....	13
○ Mutaciones en Homoplasmia + Índice de Conservación.....	13
○ Mutaciones en Homoplasmia ( <i>único criterio</i> ).....	14
○ Referencia de Patogenicidad Externa.....	15
• Discusión.....	18
• Conclusión.....	22
• Bibliografía.....	23

## **LEYENDA DE ABREVIATURAS**

*A continuación se incluye una breve leyenda con las abreviaturas usadas en más de una ocasión a lo largo de este trabajo.*

- 1-MA: 1-metiladenosina
- 5-FC: 5-formilcitosina
- 5-TM2U: 5-aurinometil-2-tiouridina
- 5-TMU: 5-aurinometiluridina
- ATP: adenosina-5'-trifosfato
- D: dihidrouridina
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- *Helix*: Base de Datos *HelixMTdb*
- mt- : mitocondrial
- N-MG: (N<sup>2</sup>)-metilguanosina
- OXPHOS: fosforilación oxidativa
- RNA: ácido ribonucleico
- MELAS: Síndrome de Encefalopatía Mitocondrial, Acidosis Láctica y Episodios Similares a Apoplejías
- tRNA: ácido ribonucleico de transferencia

## **INTRODUCCIÓN**

### **SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA**

La fosforilación oxidativa (OXPHOS) es un proceso que tiene lugar en las mitocondrias de todas las células de nuestro organismo para obtener la energía, en forma de Adenosina-5'-trifosfato o ATP, requerida para llevar a cabo sus funciones y procesos vitales. Este proceso se producirá gracias a la cadena respiratoria -conformada por una serie de complejos enzimáticos (Complejos I-IV) que forman una cadena de transporte de electrones-, junto a dos transportadores de electrones móviles y un quinto complejo enzimático (ATP sintasa). [8, 11, 20, 21]

El proceso consistirá en la conversión del gradiente de protones, generado gracias a la cadena de transporte de electrones en ATP y calor a partir de las calorías consumidas. El porcentaje dedicado a sendas funciones variará dependiendo del organismo y tejido particular. Además, se verá influido por otros procesos metabólicos como, por ejemplo, el nivel de azúcar en sangre. [2, 11, 17, 21]

Será también importante recordar que se generan especies reactivas de oxígeno que, aunque en concentraciones apropiadas sirven como moléculas señalizadoras de diversos procesos, en exceso tienen un efecto nocivo sobre el organismo. [1, 2, 17]

En consecuencia, si el Sistema OXPHOS se ve alterado se podrían observar severas repercusiones a muchos niveles orgánicos. [1, 2, 3, 4]

### **ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO MITOCONDRIAL**

Como ya se ha indicado, la fosforilación oxidativa va a tener lugar en unos orgánulos celulares conocidos como mitocondrias, que tienen la particularidad de contar con su propio DNA (ácido desoxirribonucleico). Estos orgánulos son tan ubicuos como abundantes, presentándose en todas las células del organismo (salvo los hematíes) en cantidades no despreciables.

Este ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA) consistirá en moléculas de DNA circular que contienen los genes codificantes para los ácidos ribonucleicos ribosomales (rRNAs) 12S y 16S, así como para los 22 RNAs de transferencia mitocondriales (mt-tRNAs). Dichos mt-tRNAs serán necesarios para la traducción de las 13 subunidades proteicas del Sistema OXPHOS cuya síntesis es mitocondrial, que corresponderán a los complejos I, III, IV y V del Sistema OXPHOS. [2, 3, 5, 6, 22]

En estos mt-tRNAs se han observado modificaciones en sus bases que se producen a través de complejos mecanismos enzimáticos, habiéndose demostrado posteriormente que éstas son vitales para lograr que el mt-tRNA pueda llevar a cabo sus funciones; dándole estabilidad, modificando sus dinámicas y estructura, y mejorando su capacidad de unirse al RNA mensajero. [20, 22]

Se han detectado en torno a 15 modificaciones distintas de los mt-tRNA [Tabla 1], [13], afectando a más de 100 posiciones diferentes de los 22 mt-tRNAs. Se tratará de modificaciones muy precisas y concretas (metilaciones, tiolizaciones...), irreversibles en todos

los casos salvo en la metilación de la adenina para dar lugar a 1-metiladenosina en las posiciones 16 y 58 de varios tRNAs [Tabla 1], en donde se han visto procesos de demetilación. Una de las razones para la necesidad de estas modificaciones es el hecho de que estos 22 mt-tRNAs van a tener que decodificar 60 codones diferentes y se requiere de cierta flexibilidad de los mismos; que se sumará a las mejoras aportadas en estabilidad, dinámica... [20, 22]

Hay un único caso en el que no se tratará de una modificación de una base preexistente, sino de la sustitución de ésta por una queuosina, obtenida del medio. Se tratará de la sustitución de la guanosina en la posición 37 de los mt-tRNA de Glutamina, Ácido Glutámico, Leucina, Lisina y Triptófano. [20]

<b>LEYENDA BASES MODIFICADAS</b>	
•	<b>1-MA:</b> 1-metiladenosina
•	<b>N-IA:</b> (N <sup>6</sup> )-isopenteniladenosina
•	<b>2N-MA:</b> 2-metiltio-(N <sup>6</sup> )-isopenteniladenosina
•	<b>N-TA:</b> (N <sup>6</sup> )-treonilcarbamoiladenosina
•	<b>3-MC:</b> 3-metilcitidina
•	<b>5-MC:</b> 5-metilcitidina
•	<b>5-FC:</b> 5-formilcitidina
•	<b>1-MG:</b> 1-metilguanosina
•	<b>N-MG:</b> (N <sup>2</sup> )-metilguanosina
•	<b>NN-MG:</b> (N <sup>2</sup> ,N <sup>2</sup> )-dimetilguanosina
•	<b>Q:</b> queuosina
•	<b>Ψ:</b> pseudouridina
•	<b>D:</b> dihidrouridina
•	<b>5-MU:</b> 5-metiluridina
•	<b>5-TMU:</b> 5-aurinometiluridina
•	<b>5-TM2U:</b> 5-aurinometil-2-tiouridina

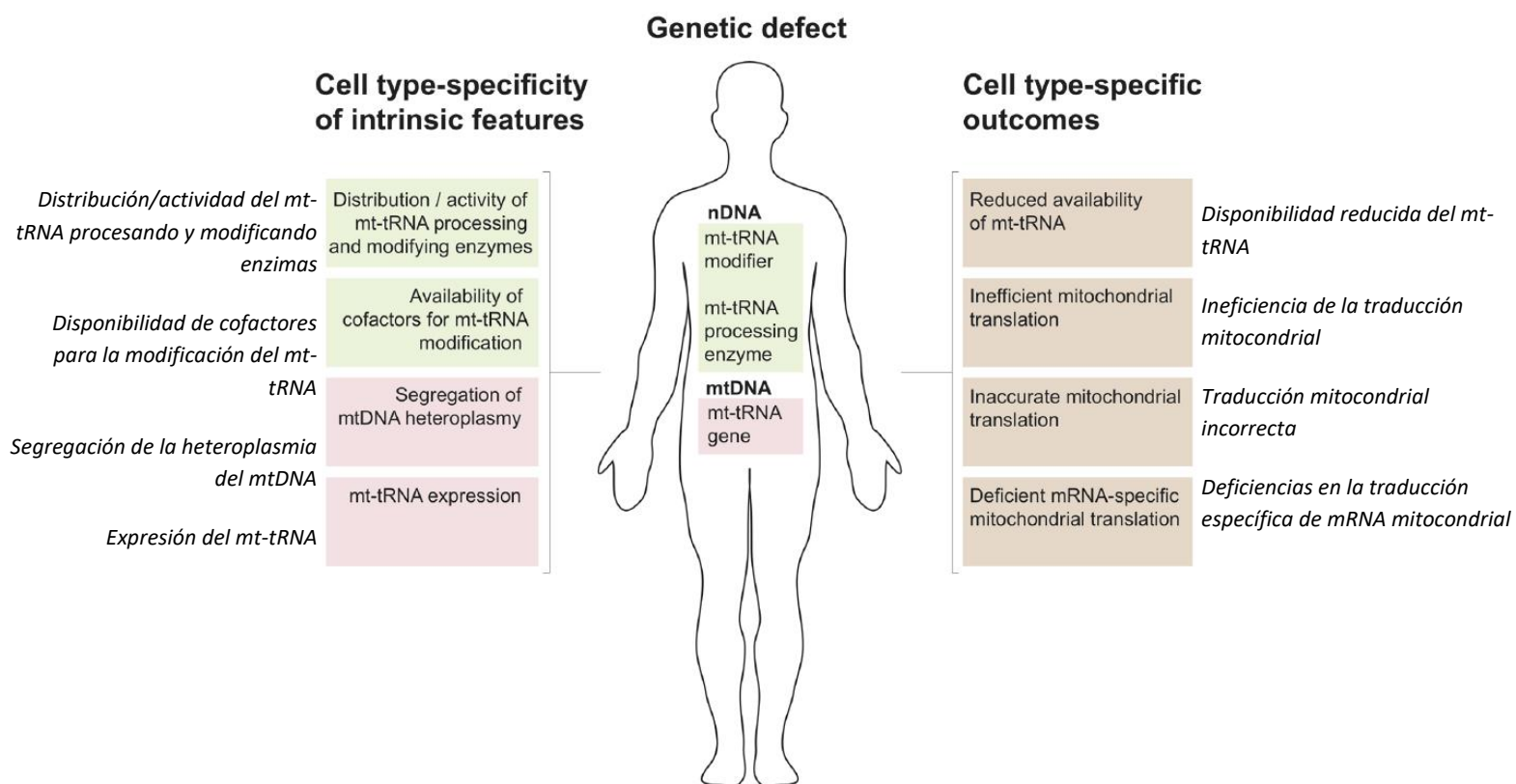
**Tabla 1:** *Abreviaturas de las Bases Modificadas de los mt-tRNAs. Abreviaturas usadas para todas las bases modificadas vistas en estado fisiológico en los mt-tRNAs humanos [3]*

## ALTERACIONES EN LOS ÁCIDOS RIBONUCLEICOS TRANSFERENTES MITOCONDRIALES

Dada la importancia de estas modificaciones en los mt-tRNAs, es lógico concluir que su alteración llevará al padecimiento de patologías mitocondriales, que son siempre enfermedades muy severas. De hecho, esta relación se ha visto tanto cuando lo que se encuentra mutado es el propio mtDNA como cuando se trata del DNA nuclear que codifica para las enzimas que catalizan las modificaciones de los mt-tRNAs. Las mutaciones genéticas de los mt-tRNAs constituyen entorno al 40 % de las mutaciones patológicas observadas. [3, 5, 6, 7, 8, 20, 21, 22]

Estas alteraciones terminarán resultando en una infra-modificación de los mt-tRNAs que, alcanzado cierto punto, producirán que estos no puedan llevar a cabo sus funciones, desembocando en una plétora de graves, incluso mortales, enfermedades mitocondriales. [20, 21, 22]

Para afianzar la noción de la relevancia de una correcta expresión de los mt-tRNAs mitocondriales, se incluye un esquema [Figura 1] en el que se relacionan propiedades intrínsecas de los mt-tRNAs con los problemas que pueden acarrear. [21]



**Fig. 1: Influencia de Factores Intrínsecos sobre Defectos Genéticos.** Esquema de la influencia de múltiples factores intrínsecos de los tipos celulares (lado izquierdo) sobre los defectos genéticos que pueden causar y las consecuencias celulares de éstos (cuadrados a la derecha). La figura está en inglés, por lo que he añadido a ambos lados las traducciones de las columnas laterales. Con lo que respecta a las centrales, de arriba abajo: modificador del mt-tRNA, enzima procesadora del mt-tRNA, gen de mt-tRNA. [21]

A pesar de lo previamente expuesto; es importante remarcar que éste sigue siendo un campo bastante inexplorado y lleno de incógnitas entre qué mutaciones dan lugar a qué patologías, el grado de severidad de éstas, etc. [21, 22]

### EJEMPLOS DE PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON MUTACIONES EN LOS ÁCIDOS RIBONUCLEICOS TRANSFERENTES MITOCONDRIALES

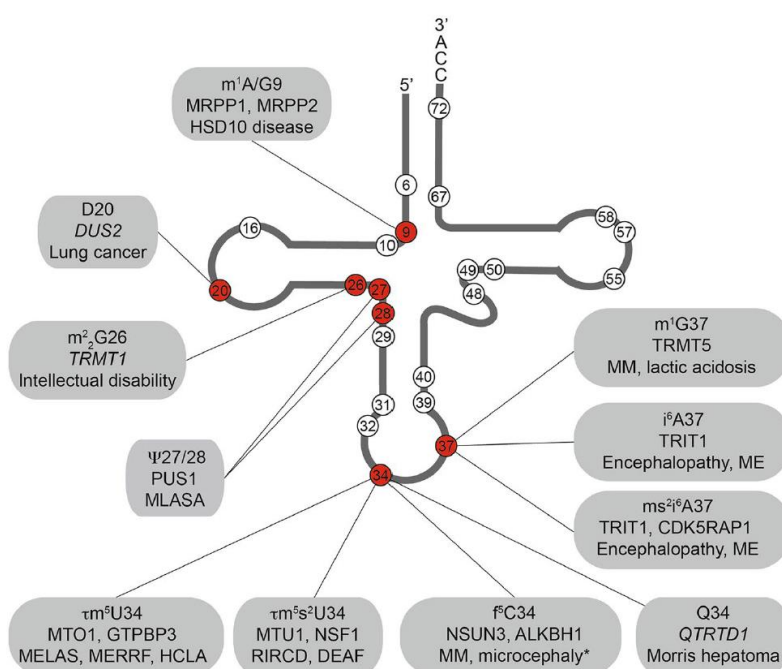
A continuación, se incluyen algunos casos para ejemplificar estas enfermedades que se han visto relacionadas con mutaciones en las bases modificadas de los mt-tRNAs:

- La ausencia de la modificación de la uridina en la posición 34 a 5-TMU (5-taurinometiluridina) del mt-tRNA para la Leucina(UUR) se ha visto relacionada con el Síndrome de MELAS (*Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*; Encefalopatía Mitocondrial, Acidosis Láctica y Episodios similares a Apoplejías). Esta modificación consistirá en una modificación a taurina catalizada por la Proteína de Unión GTP 3 (GTPB3) seguida por una metilación catalizada por Optimizador de la Traducción del tRNA Mitocondrial 1 (MTO1). Curiosamente, aunque ambas enzimas son

vitales para la correcta modificación a 5-TMU, cuando la enzima que falla es GTPB3, las patologías asociadas son más severas. [11, 12, 19, 20, 21]

- La ausencia de la modificación de la uridina en la posición 34 a 5-TMU del mt-tRNA para la Lisina se ha visto relacionada con el Síndrome de MERRF (*Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers*; Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojas Rotas). Los procesos enzimáticos serán los mismos que en el ejemplo para la Leucina(UUR). [11, 12, 19, 20, 21]
- La ausencia de la modificación de la uridina en la posición 34 a 5-TM2U (5-taurinometil-2-tiouridina) de los mt-tRNAs para Lisina, Glutamina y Ácido Glutámico se ha visto relacionada con varias patologías; entra las que destacan el fallo hepático y la sordera. La enzima encargada de catalizar la tiolización que producirá dicha modificación es la 5-metilaminometil-2-tiouridilatometiltransferasa mitocondrial humana (codificada por el gen *TRMU*). [12, 20, 21]
- La ausencia de la modificación de la cisteína en la posición 34 a 5-FC (5-formilcistidina) del mt-tRNA para la Metionina se ha relacionado con varias enfermedades asociadas a disfunción mitocondrial. Esta modificación se puede llevar a cabo por dos vías: una de ellas catalizadas por la enzima Metiltransferasa del NOP2/Sun 3 (*NSUN3*) y otra por la enzima Proteína Para la Unión de la Capucha 1 (*ABH1*). Se han visto dichas patologías para ambos fallos. [19, 20]

A continuación, se incluye una figura [Fig. 2] en la que se muestran estas modificaciones; así como otras tantas modificaciones del mt-tRNA cuyo fallo se ha visto relacionado con diversas enfermedades junto con las enzimas encargadas de las mismas y dichas patologías. [20]



**Fig. 2: Posiciones Modificadas y Patologías Asociadas.** Esquema de algunas de las posiciones más relevantes que aparecen modificadas en diversos mt-tRNAs y cuyo fallo se suele ver relacionado con diversas patologías. Cada posición relevante está marcada con un círculo rojo; la información sobre dicha posición en los rectángulos circundantes (primera línea indica la base modificada; segunda, la(s) enzima(s) encargada(s) de catalizar dicha reacción; tercera, la(s) enfermedad(es) que se han visto asociada(s). [20] Las enfermedades mencionadas en la imagen son (de izquierda a derecha, comenzando por la posición 9): Deseo Sexual Inhibido (HSD10 disease); Miopatía Mitocondrial, Acidosis Láctica y Anemia Sideroblástica (MLASA); Encefalomiopatía Mitocondrial, Acidosis Láctica y Episodios Parecidos a

*un Accidente Cerebrovascular (MELAS); Síndrome de Epilepsia Mioclónica Asociada a Fibras Rojas Rasgadas (MERRF); Leucemia de Células Capilares (HCLA); Riesgo Inflamatorio Residual por Cúmulos de Diferenciación (RIRCD); Melanoma Maligno (MM); Encefalomiелitis Miálgica (ME).*



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La hipótesis que se va a intentar demostrar en este trabajo es que las mutaciones en aquellas bases del mt-tRNA humano que presenten en su estado fisiológico normal modificaciones post-transcripcionales son potencialmente patológicas.

Esta teoría se basa, junto a las evidencias ya mencionadas en la introducción, en el hecho de que el organismo ha diseñado un mecanismo específico para cada uno de estos cambios y asumido de forma natural un gasto de energía adicional para que esto ocurra (lo cual apunta a una especial importancia en su correcta presentación, pues no es algo que el organismo haga a no ser que le sea requerido de forma particular).

Por tanto, este proyecto va a consistir en un meta-análisis de las secuencias que componen los mt-tRNAs humanos. El objetivo de éste será lograr demostrar la asociación entre las alteraciones en las bases modificadas del mt-tRNA y el padecimiento de estas enfermedades.

Con esta intención, se ha estudiado si se puede establecer una asociación entre varios parámetros relacionados con el estado, modificado o no, de las bases de estos mt-tRNAs y la potencial patogenicidad asociada a su alteración.

Para ello, se han seguido una serie de criterios; tanto externos como internos basados en datos obtenidos externamente, que serán explicados en detalle a lo largo de este informe.

Una vez se extraigan las conclusiones del estudio de la batería de datos a continuación analizada (y los artículos consultados), se verá si la hipótesis en cuestión se puede probar.

En caso afirmativo, el objetivo a largo plazo será llegar a establecer un criterio que ayude a la hora de diagnosticar patologías relacionadas con mutaciones en los mt-tRNAs humanos; identificando, recopilando y subdividiendo las mutaciones patogénicas encontradas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para llevar a cabo este estudio, se han tomado como referencia una serie de conjuntos de datos obtenidos de estudios previos; que se han analizado con las herramientas a continuación enumeradas siguiendo los criterios aquí establecidos.

### **ESTUDIOS**

Los datos que se han usado para llevar a cabo éste meta-análisis provienen de las siguientes fuentes:

- *Estructuras Químicas Completas de los tRNAs Mitocondriales* por Suzuki et al. [3]: este artículo contiene un documento adjunto con las secuencias de los mt-tRNAs humanos, incluidas modificaciones,, que ha servido para obtener todos las bases de los mt-tRNAs, viendo cuáles presentan modificaciones en su estado fisiológico y cuáles no [Anexos].
- Recopilación de genes de los mt-tRNAs de mamíferos por la Universidad de Estrasburgo [14]: base de datos donde se encuentran las secuencias de los mt-tRNAs de en torno a 150 mamíferos (que equivalen a más de 3000 secuencias de tRNA). Ha servido para poder calcular el índice de conservación.
- *Catálogo de Variantes Homo y Heteroplásmicas de DNA Mitocondrial Humano* por Bolze et al. [15]: este catálogo lleva adjunta la *Base de Datos HelixMTdb* (que será referida a partir de ahora como *Helix*), que cuenta con un exhaustivo recuento de todas las mutaciones del mtDNA, indicando si éstas aparecen en homoplasmia o en heteroplasmia para 195983 individuos estudiados. Estos individuos fueron residentes en los Estados Unidos, dieron una muestra de saliva y todas fueron estudiadas en el mismo laboratorio bajo los mismos criterios, tratando de no seleccionar una población especialmente enriquecida en fenotipos patológicos o cualquier otro fenotipo particularmente específico desde un punto de vista clínico.

### **HERRAMIENTAS**

Estos datos han sido estudiados haciendo uso de las siguientes aplicaciones:

- Microsoft Excel del paquete Microsoft Office Professional Plus 2010: usado para recopilar los datos, analizarlos y compararlos con facilidad. Se ha usado para llevar a cabo casi todos los cálculos matemáticos necesarios de forma automática.  
Todos los estudios y cálculos se han realizado por triplicado para poder asegurar que han sido llevados a cabo correctamente.

Los únicos cálculos matemáticos que no se han realizado en el propio Excel son:

- Test Exacto de Fisher (por aplicación online [16]): para comprobar si los criterios seguidos pueden confirmarse como válidos y comprobar la hipótesis planteada una vez analizados los datos.
- Frecuencia esperada: se han calculado los valores esperados frente a los obtenidos para cada una de las subclasificaciones hechas con el objetivo de observar cuál era la variación entre éstos. Se ha usado la siguiente operación manualmente:

$$Frecuencia\ esperada = \frac{Total\ Columna \times Total\ Fila}{Total\ de\ Datos}$$

**Ecuación 1:** *Fórmula de Frecuencia Esperada.* Fórmula para calcular las frecuencias esperadas de bases, modificadas o no, según cada subtipo especificado

## CRITERIOS

- Modificación de las bases: se han estudiado la totalidad de las bases que conforman los 22 mt-tRNA tomando referencia las *Estructuras Químicas Completas de los tRNAs Mitocondriales* por Suzuki et al. [3], clasificándolas bajo el criterio de presencia/ausencia de modificación en su forma fisiológica. Esta separación se ha tenido en cuenta en todos los análisis realizados, aplicando el resto de criterios sobre ambos grupos de forma separada.
- Mutaciones en homoplasma (tomando como referencia *Helix* [15]): sólo se han tenido en cuenta las mutaciones en homoplasma dado que no es posible saber el porcentaje mutado que hay en cada caso particular de heteroplasma. Mientras que una mutación homoplásmica producirá el fenotipo patológico, una heteroplásmica dependerá del porcentaje de la mutación, normalmente hace falta que sea un porcentaje considerablemente alto para ello.

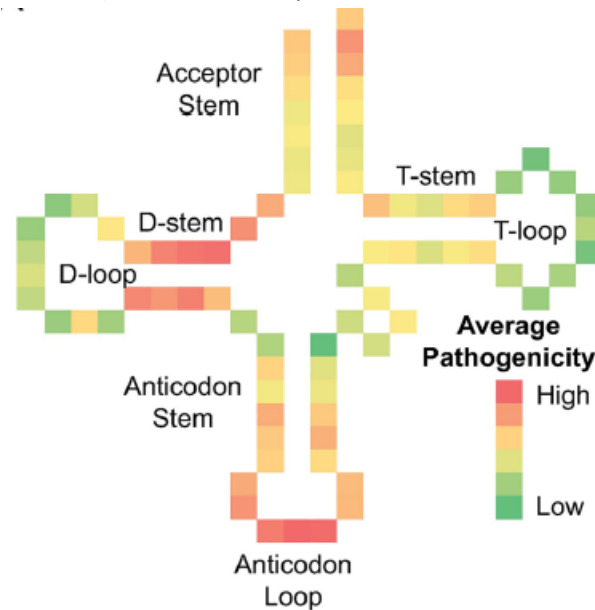
Esto es algo a tener muy en cuenta a la hora de interpretar los resultados; dado que ha supuesto tener que prescindir de parte de los datos brutos que se tenían inicialmente, y que podrían haber aportado una visión más completa en la materia. En otras palabras; ha sido una dificultad añadida a este meta-análisis.

- Frecuencia de mutaciones: se considerarán potencialmente patológicas aquellas mutaciones que aparezcan con una frecuencia baja (según un criterio más laxo de 1:1000 y más estricto de 1:10000; datos extraídos de *Helix* [15]), pues si realmente resultan perjudiciales generarán enfermedades que prevendrán su distribución en la población (el individuo no se reproducirá o morirá antes de poder hacerlo).
- Índice de conservación (calculado a partir de la base de datos generada por la Universidad de Estrasburgo consistente en una recopilación de genes de mt-tRNAs de mamíferos [14]): el hecho de que la base en una posición determinada de un tRNA codificante se haya mantenido a lo largo de la evolución puede llevar a la conclusión de la relevancia del mismo en la posterior síntesis proteica. En consecuencia, su alteración podría tener consecuencias negativas sobre el individuo que la presente. Por lo tanto, se ha buscado el primer cuartil según los porcentajes de conservación calculados; asumiendo de esta manera que existe una mayor probabilidad de que las mutaciones en las bases que caigan dentro de esta categoría resulten patológicas.

Sin embargo, han surgido ciertos problemas, puesto que los bucles T y D de los mt-tRNAs tienen longitudes demasiado variables entre especies, por lo que no se puede identificar con seguridad qué colocación corresponde a cada nucleótido del mt-tRNA humano. Por lo tanto, las bases presentes en estas posiciones no se han

estudiado. Se ha visto que las mutaciones en estas posiciones suelen estar menos relacionadas con mutaciones patogénicas [7], [Fig.3].

Dado que el realizar un análisis total ya había sido descartado, tan sólo se han calculado la conservación para 11 de estos 22 tRNAs (Alanina (Ala), Asparagina (Asn), Arginina (Arg), Aspartato (Asp), Cisteína (Cys), Glutamato (Glu), Glutamina (Gln), Glicina (Gly), Histidina (His), Isoleucina (Ile) y Leucina CUN (Leu (CUN))). Se ha incluido un Excel convertido a PDF adjunto [Anexos] con todas las secuencias que han sido alineadas [Anexos]; los cálculos posteriores de los propios índices de conservación se incluyen en una de las hojas del Excel (convertidas a PDF) con todas las operaciones realizadas [Anexos].



**Fig. 3:** *Patogenicidad de las Posiciones del mt-tRNA. Modelo de mt-tRNA según grado de patogenicidad asociado a mutaciones según la localización de las mismas.*

*Traducción empezando arriba en el sentido de las agujas del reloj: brazo aceptor, brazo T, bucle T, bucle del anticodón, brazo del anticodón, bucle D, brazo D. Traducción leyenda (de arriba abajo): Patogenicidad media, Alta, Baja. [7]*

- Criterio externo de patogenicidad: se ha utilizado MitoTIP, parte de la web MITOMAP [18], que ya ha clasificado las mutaciones vistas en los mt-tRNAs humanos según la probabilidad de que resulten ser patogénicas. A continuación, se incluye una breve explicación de los criterios seguidos por dicha página:

MitoTIP trata de estudiar las variantes de mt-tRNAs observadas para determinar la probabilidad de que éstas resulten patogénicas. Para ello, se fijará en:

- Las frecuencias de mutaciones vistas en la base de datos GenBank, a las cuáles han aplicado un criterio propio para determinar si son relevantes o no.
- La naturaleza del cambio nucleotídico: transversión, transición o eliminación.
- El índice de conservación: tomando como referencia La Recopilación de genes de tRNA mitocondrial de mamíferos por la Universidad de Estrasburgo [14].

No se incluyen ni el historial clínico de los sujetos estudiados, ni las mutaciones vistas en heteroplasmia, ni los estudios funcionales.

Cada cambio recibirá un porcentaje de probabilidad de patogenicidad y, dependiendo de éste, se podrá clasificar en seguramente patogénico, posiblemente patogénico, posiblemente benigno y seguramente benigno dependiendo del cuartil en el que se sitúen. Algunas, aunque suponen el menor porcentaje total, se clasifican como patológicas confirmadas. [18], [Tabla 2].

Sobre este sistema es necesario añadir que la propia página web recomienda que no se tome en ningún caso como totalmente seguro, pues el hecho de que se base exclusivamente en otras bases de datos juega en su contra y, en caso de querer confirmar con total seguridad la patogenicidad de una mutación, más estudios deberían ser llevados a cabo.

<b>Current Raw Scores</b> (range: -5.9 – 21.8)	<b>Quartile</b>	<b>Quartile Ranking / Score Interpretation</b>
>16.25	>75 - 100%	likely pathogenic
12.66 – 16.25	>50 - 75%	possibly pathogenic
8.44 – 12.66	>25 - 50%	possibly benign
< 8.44	0 - 25%	likely benign

**Tabla 2:** *Cuartiles del Nivel de Patogenicidad Mutacional.* Criterios seguidos por MITOMAP a la hora de asignar un grado de posible patogenicidad a las mutaciones vistas en los mt-tRNAs a partir de puntuaciones brutas en un rango de -5.9 a 21.8 (columna izquierda), distribuidos en una serie de cuartiles (columna de en medio) que se interpretan dentro de las siguientes categorías: muy posiblemente patogénico, posiblemente patogénico, posiblemente benigno, muy posiblemente benigno (de arriba abajo). [18]

Otro hecho que juega en contra de los resultados que de estos datos se puedan extraer es que se trata de una base de datos más antigua (2007) que *Helix* (2019) [15], lo cual quiere decir que contiene menos individuos analizados (pues el estudio de *Helix* se realizó años después de que esta base se formara). Esto será relevante porque la actualización y aumento de datos registrados en estas bases siempre añade una mayor fiabilidad sobre las mismas.

## RESULTADOS

Adjunto a este informe se incluye un documento Excel convertido a PDF con todos los datos y cálculos realizados a lo largo del estudio. [Anexos]

### **MUTACIONES EN HOMOPLASIA + ÍNDICE DE CONSERVACIÓN**

Se ha generado una tabla en la que se han contabilizado las bases de los 22 mt-tRNA según si en estado fisiológico presentan o no modificaciones y, en cada caso, si se han visto un número de mutaciones potencialmente patogénicas relevante o no [Anexos].

A este criterio se ha añadido una criba teniendo en cuenta el índice de conservación [Anexos], tomando como nucleótidos relevantes a la hora del estudio de la potencial patogenicidad exclusivamente aquellas bases que cuenten con un índice de conservación superior al primer cuartil de conservación (calculado con Excel; 79.4%). [Anexos] Es decir, aquellas que más se hayan preservado a lo largo de la evolución.

Se ha tomado como criterio el considerar relevante el número de individuos mutados si éste equivale a 1:1000 o menos, lo cual con la cantidad de datos proporcionada por *Helix* [15] correspondería a entre 1 y 195 individuos mutados en homoplasmia. Los resultados se incluyen en la Tabla 3.

<b>1::1000</b>	<b>M</b>	<b>N</b>
<b>P</b>	15	119
<b>NP</b>	49	446
<b>1::1000</b>	<b>M</b>	<b>N</b>
<b>P</b>	14	120
<b>NP</b>	50	445

**Tabla 3:** *Mutaciones Relevantes en Homoplasmia Considerando el Índice de Conservación.* Tablas con los resultados en lo que respecta a la presencia de mutaciones relevantes en homoplasmia en aquellas bases que presentan un elevado índice de conservación, donde M indica que dicha base en estado fisiológico está modificada, N que no lo está (normal), P que se han localizado mutaciones potencialmente patológicas y NP para las potencialmente no patológicas. La tabla **superior** (con los resultados en negro) equivale a los resultados observados, mientras que la de **abajo** (con los resultados en rojo) equivale a los resultados esperados. El criterio seguido se indica en el recuadro en negro (con qué frecuencia debe aparecer individuos mutados).

Al calcular los valores esperados frente a los obtenidos [Ecuación 1], se ha visto que los resultados apenas varían. [Anexos] [Tabla 3].

Al analizar estos resultados por el Test de Fischer [16] (aplicando un nivel de significación de 0.05), el resultado obtenido ha sido no significativo. La p obtenida ha sido de 0.6318.

Es necesario recordar que no se han incluido los lazos T y D de los mt-tRNAs en el análisis por una imposibilidad de realizar una alineación fiable y que tan sólo se han podido estudiar 11 de los 22 mt-tRNAs.

### MUTACIONES EN HOMOPLASMIA (*único criterio*)

Los resultados obtenidos al aplicar el criterio de mutaciones en homoplasma junto al índice de conservación podrían estar influidos por la falta de datos para el índice de conservación. En consecuencia, se ha realizado el análisis del total de las mutaciones en homoplasma, pero sin tener en cuenta esta vez el índice de conservación. [Anexos]

Se han vuelto a aplicar los criterios de homoplasma, comenzando por los aplicados en el estudio anterior. Esto es, considerando relevante el número de mutaciones si éste equivale a 1:1000 o menos (entre 1 y 195 individuos mutados en homoplasma). Los resultados se incluyen en la Tabla 4.

1::1000	M	N
P	34	479
NP	103	892
1::1000	M	N
P	47	466
NP	90	905

**Tabla 4:** *Mutaciones Relevantes en Homoplasma (1:1000).* Tablas con los resultados en lo que respecta a la presencia de mutaciones relevantes en homoplasma, donde M indica que dicha base en estado fisiológico está modificada, N que no lo está (normal), P que se han localizado mutaciones potencialmente patológicas y NP para las potencialmente no patológicas. La tabla **superior** (con los resultados en negro) equivale a los resultados observados, mientras que la de **abajo** (con los resultados en rojo) equivale a los resultados esperados. El criterio seguido se indica en el recuadro en negro (con qué frecuencia debe aparecer individuos mutados).

Se han calculado los resultados esperados frente a los obtenidos [Ecuación 1], obteniendo que el número de bases modificadas potencialmente patogénicas esperadas es más elevado que el observado. [Anexos] [Tabla 4].

Se han sometido los resultados obtenidos al Test Exacto de Fischer [16] (aplicando un nivel de significación de 0.05). Se ha obtenido una p con valor significativo (0.0179).

Al obtenerse resultados contrarios a lo esperado en nuestras hipótesis, se ha probado a establecerse un criterio más estricto. Cosa que se ha podido realizar al no haber obtenido una cantidad excesivamente pequeña en ninguna de los subgrupos (ningún valor inferior a cinco, que hace el Test Exacto de Fisher [16] menos fiable. Se ha probado a establecer un criterio más restrictivo. Con este objetivo, se ha aplicado un criterio de 1:10000 (entre 1 y 19 individuos mutados en homoplasma se considerarán relevantes). Los resultados se incluyen en la Tabla 5. [Anexos]

Se han vuelto a calcular los resultados esperados frente a los obtenidos [Ecuación 1], obteniéndose un número de bases modificadas potencialmente patogénicas esperadas ligeramente superior al observado [Tabla 5] [Anexos]

<b>1::10000</b>	<b>M</b>	<b>N</b>
<b>P</b>	22	298
<b>NP</b>	115	1073
<b>1::10000</b>	<b>M</b>	<b>N</b>
<b>P</b>	29	291
<b>NP</b>	93	1080

**Tabla 5:** *Mutaciones Relevantes en Homoplasmia (1:10000).* tablas con los resultados en lo que respecta a la presencia de mutaciones relevantes en homoplasmia, donde M indica que dicha base en estado fisiológico está modificada, N que no lo está (normal), P que se han localizado mutaciones potencialmente patológicas y NP para las potencialmente no patológicas. La tabla **superior** (con los resultados en negro) equivale a los resultados observados, mientras que la de **abajo** (con los resultados en rojo) equivale a los resultados esperados. El criterio seguido se indica en el recuadro en negro (con qué frecuencia debe aparecer individuos mutados).

Se ha realizado de nuevo el Test Exacto de Fischer [16] (aplicando un nivel de significación de 0.05). Se ha obtenido un valor de p no significativo (0.1263).

#### REFERENCIA DE PATOGENICIDAD EXTERNA

Usando como referencia MitoTIP [18] se ha generado una tabla en la que se han contabilizado las bases de los 22 mt-tRNA según si en estado fisiológico presentan o no modificaciones y, en cada caso, si bajo los criterios establecidos por dicha aplicación las modificaciones pueden ser potenciales causas de enfermedades. [Anexos] Los criterios usados por MitoTIP (tal y como están enumerados en el apartado de Métodos y Herramientas) son los siguientes:

- Las frecuencias de mutaciones vistas en GenBank y analizadas con una serie de herramientas online que incluyen Haplogrep y BLASTn.
- La naturaleza del cambio nucleotídico; que puede ser transversión, transición o eliminación.
- El índice de conservación, tomando como referencia La Recopilación de genes de mt-tRNAs de mamíferos por la Universidad de Estrasburgo [14].

En primer lugar, para establecer el criterio de presencia o ausencia de patología se han considerado los tres niveles de mayor probabilidad dados por dicha base de datos (posiblemente patológica, seguramente patológica y patológica confirmada). Esta distribución se puede ver en la Tabla 6.



3Niveles	M	N
P	18	152
NP	119	1219
3Niveles	M	N
P	15	155
NP	122	1216

**Tabla 6:** *Mutaciones Relevantes Según MitoTIP con 3 Niveles de Patogenicidad.* Tablas con los resultados en lo que respecta a la presencia de mutaciones relevantes según los criterios de MitoTIP tomando tres niveles de potencial patogenicidad, donde M indica que dicha base en estado fisiológico está modificada, N que no lo está (normal), P que se han localizado mutaciones potencialmente patológicas y NP para las potencialmente no patológicas. La tabla **superior** (con los resultados en negro) equivale a los resultados observados, mientras que la de **abajo** (con los resultados en rojo) equivale a los resultados esperados. El criterio seguido se indica en el recuadro en negro (cuántos niveles de potencial patogenicidad se han considerado relevantes).

Se han calculado los resultados esperados frente a los obtenidos [Ecuación 1], obteniendo que el número de bases modificadas potencialmente patogénicas esperadas es ligeramente inferior al valor observado. [Anexos] [Tabla 6].

Se ha aplicado el Test Exacto de Fischer [16] (aplicando un nivel de significación de 0.05). Obteniendo un resultado no significativo; con una p de 0.4782.

A continuación, como las cantidades en todas las categorías seguían estando dentro de un rango aceptable (no inferior a cinco, que hace el Test Exacto de Fisher [16] menos fiable), se redujo a sólo dos niveles de mayor probabilidad patogénica (seguramente patológica y patológica confirmada). Los resultados de dicha distribución se pueden ver en la Tabla 7.

2Niveles	M	N
P	13	81
NP	124	1290
2Niveles	M	N
P	9	85
NP	128	1286

**Tabla 7:** *Mutaciones Relevantes Según MitoTIP con 2 Niveles de Patogenicidad.* Tablas con los resultados en lo que respecta a la presencia de mutaciones relevantes según los criterios de MitoTIP tomando tres niveles de potencial patogenicidad, donde M indica que dicha base en estado fisiológico está modificada, N que no lo está (normal), P que se han localizado mutaciones potencialmente patológicas y NP para las potencialmente no patológicas. La tabla **superior** (con los resultados en negro) equivale a los resultados observados, mientras que la de **abajo** (con los resultados en rojo) equivale a los resultados esperados. El criterio seguido se indica en el recuadro en negro (cuántos niveles de potencial patogenicidad se han considerado relevantes).

De nuevo, se calcularon los resultados esperados frente a los obtenidos [Ecuación 1], obteniendo que el número de bases modificadas potencialmente patogénicas esperadas es ligeramente inferior al valor observado. [Anexos] [Tabla 7].

Se ha aplicado el Test Exacto de Fischer [16] (aplicando un nivel de significación de 0.05). Obteniéndose una p de 0.1344.

Viendo que los valores numéricos obtenidos seguían estando dentro del rango aceptable (no inferior a cinco, que hace el Test Exacto de Fisher [16] menos fiable), se redujo a un solo nivel de probabilidad de patogenidad (patológica confirmada). Esta distribución está representada en la Tabla 8.

1Nivel	M	N
P	7	37
NP	130	1334
1Nivel	M	N
P	4	40
NP	133	1331

*Tabla 8: Mutaciones Relevantes Según MitoTIP con un Nivel de Patogenicidad. Tablas con los resultados en lo que respecta a la presencia de mutaciones relevantes según los criterios de MitoTIP tomando tres niveles de potencial patogénica, donde M indica que dicha base en estado fisiológico está modificada, N que no lo está (normal), P que se han localizado mutaciones potencialmente patológicas y NP para las potencialmente no patológicas. La tabla **superior** (con los resultados en negro) equivale a los resultados observados, mientras que la de **abajo** (con los resultados en rojo) equivale a los resultados esperados. El criterio seguido se indica en el recuadro en negro (cuántos niveles de potencial patogénica se han considerado relevantes).*

Al igual que en los casos anteriores, se calcularon los resultados esperados frente a los obtenidos [Ecuación 1], obteniendo que el número de bases modificadas potencialmente patogénicas esperadas es ligeramente inferior al valor observado. [Anexos] [Tabla 8]

Se ha aplicado el Test Exacto de Fischer [16] (aplicando un nivel de significación de 0.05). Obteniendo un resultado no significativo; con una p por valor de 0.1114. A pesar de no ser significativo, se produce una reducción con respecto a los anteriores.

## DISCUSIÓN

Tal como se puede extrapolar de los resultados obtenidos, no se ha podido establecer en firme una relación entre que las bases que conforman los mt-tRNAs presenten modificaciones en su estado fisiológico y que las mutaciones en dichas bases sean de especial relevancia a la hora de padecer diversas patologías.

Una de las primeras conclusiones que se podrían sacar es que, sencillamente, no existe relación alguna entre ambos eventos. Sin embargo, tal y como se ha comentado ya en varias ocasiones en este informe, las modificaciones de los nucleótidos suponen al organismo un gasto de energía nada despreciable, así como el diseño de una ruta con dicho fin muy compleja y perfectamente regulada.

Dado que, por norma general, el cuerpo humano sólo dedica tal cantidad de energía y recursos en casos de elementos de vital importancia para su propio buen funcionamiento; esta teoría no se va a considerar como una de las más posibles en este trabajo. Sin embargo, esto no quiere decir que se descarte, pues es una posibilidad tan real como las que a continuación se van a discutir.

A esto hay que sumarle el hecho que, tal y como se ha ejemplificado en la introducción, hay casos comprobados en los que el fallo/ausencia de modificaciones en estas bases lleva a sufrir patologías a los individuos en cuestión (Síndrome de MELAS por ausencia de la modificación de la uridina en la posición 34 a 5-TMU del mt-tRNA para la Leucina(UUR) o fallo hepático por ausencia de la modificación de la uridina en la posición 34 a 5-TM2U del mt-tRNA para la Lisina; entre otras).

También juega en contra de este argumento el hecho de que, si bien los resultados obtenidos para los valores estadísticos son, por norma general, demasiado elevados con el valor de significación asumido (0.05), se aprecia una tendencia decreciente de los mismos. Este hecho es especialmente llamativo en el caso de los análisis de los datos obtenidos de MITOMAP, que disminuye considerablemente al volverse más estrictos los criterios seguidos.

Por lo tanto, a continuación se van a proponer una serie de hipótesis del porqué de estos resultados. Así como sugerencias para futuros análisis.

Un punto que no se puede obviar son las dificultades que se han ido presentado a lo largo del meta-análisis y como éstas han podido afectar a los resultados finales.

Va a ser necesario tener en cuenta que en todos los estudios llevados a cabo se ha partido de bases de datos previamente existentes, cuyo contenido en ningún momento ha sido cuestionado; siempre existiendo la posibilidad, por pequeña que ésta sea, de que éste no fuera lo bastante completo y/o contuviera errores.

En esta misma línea de pensamiento, cabe remarcar que para cada análisis se ha usado una única base de datos (*Estructuras Químicas Completas de los tRNAs Mitocondriales* por Suzuki et al. [3] para apuntar las secuencias de los mt-tRNA –incluidas modificaciones-, *Helix*

[15] para la frecuencia poblacional mutacional, la base creada por la Universidad de Estrasburgo para hallar el índice de conservación [14] y MITOMAP [18] para la potencial patología de los polimorfismos) cuando lo recomendable hubiera sido comparar cada apartado con, al menos, dos fuentes de información diferentes. Sin embargo, esto último no ha sido posible debido a que sólo existe un estudio que incluya todas las modificaciones de los mt-tRNAs humanos [3], la Base de Estrasburgo [14] es la única que cuenta con múltiples alineamientos de los mt-tRNAs de multitud de muy diversas especies y *Helix* [15] el único estudio de extensión considerable analizando las mutaciones en el mtDNA humano. Por último, MITOMAP [18], al ser una base de consulta general sobre variaciones de en el mtDNA, usa múltiples fuentes para elaborar sus propios datos, se puede considerar que por sí misma ya abarca varias bases de datos.

Centrándose en la base de datos seguida para determinar si las bases de los mt-tRNAs estaban o no modificadas; este meta-análisis se ha basado en un solo estudio. Esto ha tenido que hacerse así porque, tal y como se ha comentado anteriormente, el único estudio completo hasta la fecha publicada incluyendo todas las modificaciones de los mt-tRNAs humanos.

Si existiera otro estudio que también hubiera definido todas las modificaciones en estado fisiológico de los 22 mt-tRNAs humanos, una idea interesante para comprobar si esta anotación es válida sería realizar una comparativa entre los datos contenidos en ambos artículos. Si éstos coincidieran, nos daría más seguridad sobre nuestros resultados (y viceversa).

Dado que esta opción no es posible, se va estudiar si las bases que en este estudio se han considerado modificadas aparecen como tales en otros trabajos (aunque éstos no cuenten con la totalidad de los mt-tRNAs secuenciados), pues su presencia en varios análisis del mt-tRNA humano contará a favor de considerar estos datos fiables. Se ha encontrado un artículo estudiando estas modificaciones [9], viéndose que las bases modificadas de los mt-tRNAs coinciden en su mayoría. Algunos ejemplos son (usando las abreviaturas de Tabla 1):

- Posición 9 del m-tRNA para la Lisina: adenina modificada a 1-MA.
- Posición 10 del m-tRNA para el Ácido aspártico: guanina modificada a N-MG.
- Posición 54 del m-tRNA para la Serina (UCN): adenina modificada a 1-MA.

A su vez, ayuda a reafirmar esta teoría el ver que en estudios independientes en los que se han clasificado las modificaciones de una especie cercana evolutivamente al ser humano (*Bos taurus*, de nombre común vaca) se puede observar la conservación de algunas de estas modificaciones [19, 20]:

- Posición 9 del mt-tRNA para la Alanina: adenina modificada a 1-MA.
- Posición 10 del mt-tRNA para la Asparagina: guanina modificada a N-MG.
- Posición 20 del mt-tRNA para la Leucina (UUR): uridina modificada a D.

Focalizándose en el caso en el que se ha aplicado el criterio de homoplasia junto al índice de conservación, se puede ver que los resultados son claramente los peores de entre todos los análisis realizados.

Lo más probable es que estos resultados negativos se deban a la forma en la que se han recopilado los datos para el índice de conservación: sin contabilizar dos secciones enteras de la estructura de los mismos por problemas a la hora de linearizar. Para poder realizar el índice de conservación de forma óptima en caso de querer tomarlo en cuenta en posteriores estudios debería realizarse un estudio a fondo que llevara a la determinación de un criterio fiable para poder alinear los bucles T y D. Poder contar con este criterio sería una gran ventaja para estos potenciales análisis futuros.

Además, no hay que olvidar que sólo se ha realizado sobre la mitad de los mt-tRNAs.

En lo que respecta a las mutaciones, más allá de las potenciales problemáticas ya mencionadas en un contexto más global del meta-análisis en su conjunto, nos encontramos con ciertos factores que podrían haber llevado a resultados no tan fiables como debieran.

Por una parte, tener en cuenta que no se han contado las mutaciones que se presentaban en heteroplasia, puesto que no se contaban con los datos suficientes para poder saber si estaban en cantidad suficiente como para ser consideradas significativas o no.

Por otro lado, hay que considerar la posibilidad que se haya sobre-simplificado el papel de las mutaciones en este sistema; pues puede que ciertas mutaciones en una base concreta no afecten la modificación en esta propia base (o no exclusivamente), sino a aquellas que estén cercanas a la misma dentro del mismo mt-tRNA. Esto significaría que mutaciones vistas en bases no modificadas pudieran estar alterando las modificaciones post-transcripcionales de bases cercanas. Algunos ejemplos localizados hasta la fecha son:

- La mutación m.3243A>G (bucle D) en el mt-tRNA para la Leucina (UUR) lleva a que no se produzca la modificación a 5-TMU de la uridina en la posición 34, causando el Síndrome de MELAS. [3, 19, 21]
- La mutación m.3250T>C (bucle D) en el mt-tRNA para la Leucina (UUR) se ha visto relacionada en la ausencia de modificaciones en el brazo DHU, que llevan al no correcto plegamiento del mismo. [19, 23]
- Mutación en G-37 (no se ha precisado en tanto detalle cuál debe ser ésta, a diferencia de en los casos anteriores) en el mt-tRNA para la Glutamina impiden la correcta interacción de enzimas modificadores con bases cercanas, resultando en trastornos en la respiración celular. [19, 20]

A su vez, también podrían darse casos en los que estas mutaciones, lejos de suponer un contratiempo a la hora de que una base aparezca modificada, favorezcan dicha modificación (o la hagan aparecer donde antes no estaba presente).

Este es un campo especialmente interesante, en el cuál sería interesante y que podría tener una gran utilidad el indagar en mayor detalle en un futuro. Sin embargo, de nuevo, estos

criterios no se han podido tomar con tanto detalle cómo se debiera debido a la ausencia de información y métodos para obtenerla.

Centrándose en los criterios de patogenicidad, hay que tener en cuenta que la propia base de datos MitoTIP [18] avisa de la necesidad de comparar la información de ella extraída con otros portales/bibliotecas de bases datos.

La información contenida en MitoTIP, si bien muy curada, todavía está sujeta a mejoras, como bien se puede observar en el hecho de que esté continuamente actualizándose al incluirse nuevas secuencias en su base de datos. [10, 18]

Una vez dicho esto; no hay que olvidar que, a pesar de los problemas abordados en los párrafos previos, la reducción del valor de  $p$  al realizar el Test Exacto de Fischer [16] ha ido en aumento con el grado de exigencia para considerar una mutación patológica, especialmente al reducir de tres niveles de potencial patogenicidad a dos, quedándose los resultados a partir de este punto cerca de alcanzar la significancia. Este hecho lleva, de nuevo, a pensar que la hipótesis aquí defendida no debe ser descartada. En la línea seguida anteriormente, estos resultados llevan de nuevo a plantear que, posiblemente, sea necesario revisar y contrastar más la información usada y afinar más los criterios seguidos.

En este último aspecto -y teniendo en cuenta el mensaje del propio MitoTIP-, una opción sería aplicar los criterios aquí estudiados de forma combinada: para considerar la mutación en una base potencialmente patogénica, debe aparecer tanto en *Helix* cumpliendo los criterios antes explicados como en MitoTIP.

## **CONCLUSIÓN**

Resumiendo, aunque con este meta-análisis no ha podido probarse la relación entre la modificación de los nucleótidos que conforman los mt-tRNAs y el hecho de que las mutaciones que en estas bases tengan una mayor probabilidad de poder resultar en enfermedades en los individuos afectados, sí que se han visto resultados prometedores.

Lograr probar esto supondría un avance en el estudio de las enfermedades de origen mitocondrial, puesto que podría llevar a una mayor automatización a la hora de buscar las mutaciones que podrían estar causando la patología particular que sufra el paciente; agilizando el proceso de diagnóstico y, por consiguiente, posterior tratamiento.

Tener muy en cuenta para esto lo costoso, tanto a nivel económico como de tiempo, que sigue resultando la secuenciación entera del genoma de cada paciente, por lo que, sabiendo exactamente dónde buscar, se podría volver un proceso de diagnóstico mucho más cotidiano y rápido.

Consecuentemente, mi recomendación práctica sería seguir esta línea de investigación; buscando probar la tesis que aquí no se ha conseguido demostrar. Para tratar de mejorar estos resultados, se podrían aplicar las siguientes pautas sobre el estudio realizado:

- A la hora de obtener los datos correspondientes a cada criterio seguido, comparar más de una base de datos para poder aseverar con mayor seguridad su validez.
- Estudiar la posibilidad de combinar varios de estos criterios para una mayor exigencia a la hora de obtener los resultados finales
- Buscar más criterios/criterios diferentes a los aquí discutidos, también con el objetivo de una mayor precisión en los resultados obtenidos.
- Si los avances en la ciencia hacen que su utilización sea un escenario más plausible; añadir no sólo las mutaciones presentes en homoplasmia, sino también aquellas en heteroplasmia para las que se pueda probar que la base mutada está en un porcentaje lo bastante elevado como para que sea el fenotipo patológico aquel que se observe en estos individuos.
- Aplicar el índice de conservación en su totalidad. Es decir; calcularlo para los 22 mt-tRNAs y buscar una metodología que permita alinear correctamente los bucles T y D (colaborar con un equipo especializado en Bioinformática sería interesante para lograr este punto).

En conclusión; si se siguen estos nuevos criterios soy de la opinión de que se podrían obtener resultados concluyentes positivos sobre la relación entre la modificación de las bases que conforman los mt-tRNAs en su estado fisiológico y la patogenicidad asociada a las mutaciones que afectan a las mismas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Vander Heiden M, Cantley L, Thompson C. The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* (80- ). 2009; 324(5930):1029–33.
2. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005; 39:359–407.
3. Suzuki T, Yashiro Y, Kikuchi I, Ishigami Y, Saito H, Matsuzawa I, et al. Complete chemical structures of human mitochondrial tRNAs. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18068-6>
4. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* 2008; 7(1):11–20.
5. Yarham JW, Al-Dosary M, Blakely EL, Alston CL, Taylor RW, Elson JL, et al. A comparative analysis approach to determining the pathogenicity of mitochondrial tRNA mutations. *Hum Mutat.* 2011; 32(11):1319–25.
6. Wei FY, Zhou B, Suzuki T, Miyata K, Ujihara Y, Horiguchi H, et al. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contributes to myopathy in mice and humans. *Cell Metab* [Internet]. 2015;21(3):428–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.019>
7. Sonney S, Leipzig J, Lott MT, Zhang S, Procaccio V, Wallace DC, et al. Predicting the pathogenicity of novel variants in mitochondrial tRNA with MitoTIP. *PLoS Comput Biol.* 2017; 13(12):1–8.
8. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2010;1797(2):113–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.09.005>
9. Lorenz C, Lünse CE, Mörl M. Trna modifications: Impact on structure and thermal adaptation. *Biomolecules.* 2017;7(2).
10. <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/MitoTipInfo> Utilizada para extraer información sobre cómo se marcan los criterios en MitoTIP; el 23/05/2021 y el 01/06/2021.
11. Murayama K, Shimura M, Liu Z, Okazaki Y, Ohtake A. Recent topics: the diagnosis, molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. *J Hum Genet* [Internet]. 2019;64(2):113–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s10038-018-0528-6>
12. Luo LF, Hou CC, Yang WX. Nuclear factors: Roles related to mitochondrial deafness. *Gene.* 2013; 520(2):79–89.
13. Sprinzl M, Vassilenko KS. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(DATABASE ISS.):139–40.
14. <http://mamit-trna.u-strasbg.fr/> Consultadas las secuencias de tRNA que se encuentran bajo el apartado tRNA gene sequences; entre el 17/11/2020 y el 14/01/2021



15. Bolze A, Mendez F, White S, Tanudjaja F, Isaksson M, Jiang R, et al. A catalog of homoplasmic and heteroplasmic mitochondrial DNA variants in humans. 2019; 1–39.
16. <https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx> Utilizada para calcular los Test de Fischer Exactos tal y como se indica en el menú nada más abrir el enlace; entre el 08/02/2021 y el 11/02/2021; y el 25/07/2021.
17. Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS). Dose-Response. 2014; 12(2):288–341.
18. Lott, M.T., Leipzig, J.N., Derbeneva, O., Xie, H.M., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V., and Wallace, D.C. 2013. mtDNA variation and analysis using MITOMAP and MITOMASTER. Current Protocols in Bioinformatics 1(123):1.23.1-26. PMID: 25489354 URL: <http://www.mitomap.org>
19. Kazuhito T, Wei FY. Posttranscriptional modifications in mitochondrial tRNA and its implication in mitochondrial translation and disease. J Biochem. 2020;168(5):435–44.
20. Bohnsack MT, Sloan KE. The mitochondrial epitranscriptome: the roles of RNA modifications in mitochondrial translation and human disease. Cell Mol Life Sci. 2018; 75(2):241–60.
21. Powell CA, Nicholls TJ, Minczuk M. Nuclear-encoded factors involved in post-transcriptional processing and modification of mitochondrial tRNAs in human disease. Front Genet. 2015; 5(FEB):1–15.
22. Chen H-W, Rainey RN, Balatoni CE, Dawson DW, Troke JJ, Wasiak S, et al. Mammalian Polynucleotide Phosphorylase Is an Intermembrane Space RNase That Maintains Mitochondrial Homeostasis. Mol Cell Biol. 2006; 26(22):8475–87.
23. Danchin EGJ, Pontarotti P. Towards the reconstruction of the bilaterian ancestral pre-MHC region. Trends Genet. 2004;20(12):587–91.